

PCT/JP 03/13658

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

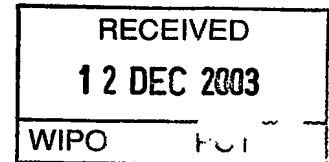
24.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 0 月 2 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 0 9 2 4 8
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 0 9 2 4 8]



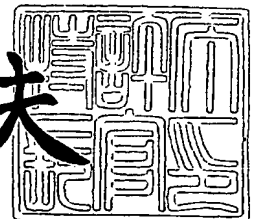
出 願 人
Applicant(s): 明治製菓株式会社
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 MEJ021699P

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区師岡町 7 6 0 明治製菓株式会社
薬品総合研究所内

【氏名】 三輪 岳宏

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田 5 - 3 - 1 明治製菓株式会社 ヘ
ルス・バイオ研究所内

【氏名】 西沢 耕治

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田 5 - 3 - 1 明治製菓株式会社 ヘ
ルス・バイオ研究所内

【氏名】 林 淑恵

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 3 - 6 - 1 3 ニューマリッチ中山
2 0 5

【氏名】 村山 裕一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 1 - 1 8 - 1 - 4 0 6 - 4 0 1

【氏名】 吉岡 都

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市小野川 9 - 4 5

【氏名】 三浦 克洋

【特許出願人】

【識別番号】 000006091

【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 501203344

【氏名又は名称】 独立行政法人 農業技術研究機構

【代理人】

【識別番号】 100090251

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 憲一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 017813

【納付金額】 12,600円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 6 0 / 1 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 難分解性タンパク質を分解する新規なプロテアーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の性質を有し、難分解性タンパク質分解活性を有する酵素。

- (a) 作用及び基質特異性：難分解性タンパク質のペプチド結合を加水分解する。
- (b) 分子量：26,000 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による)
- (c) 等電点：pI 9.3 (ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動による)
- (d) 至適 pH：pH 9.0～10.0 である。
- (e) 作用至適温度：60～70℃ である。

【請求項 2】 バチルス属に属する微生物由来である、請求項 1 に記載の酵素。

【請求項 3】 バチルス属に属する微生物が、バチルス・リケニフォルミスである、請求項 2 に記載の酵素。

【請求項 4】 バチルス・リケニフォルミスが、バチルス・リケニフォルミス FERM P-19068 菌株である、請求項 3 に記載の酵素。

【請求項 5】 難分解性タンパク質が病原性プリオンタンパク質である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の酵素。

【請求項 6】 請求項 1～5 のいずれか一項に記載の酵素を含む、酵素組成物。

【請求項 7】 難分解性タンパク質分解活性として 20～500 単位/g の活性を示す、請求項 6 に記載の酵素組成物。

【請求項 8】 請求項 1～5 のいずれか一項に記載の酵素を有効成分として含有する、難分解性タンパク質分解剤。

【請求項 9】 請求項 1～5 のいずれか一項に記載の酵素、あるいは、請求項 5 又は 6 に記載の酵素組成物を用いる、難分解性タンパク質を分解する方法。

【請求項 10】 請求項 1～5 のいずれか一項に記載の酵素を有効成分とし

て含有する、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物に対する病原性プリオンタンパク質無毒化剤。

【請求項 11】 請求項 1～5 のいずれか一項に記載の酵素、あるいは、請求項 5 又は 6 に記載の酵素組成物を用いる、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物における病原性プリオンタンパク質を無毒化する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、難分解性タンパク質（特に、病原性プリオンタンパク質）を分解する新規なプロテアーゼに関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒツジ若しくはマウスのスクレイピー、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病〔Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)〕、又はウシの牛海綿状脳症〔Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)；俗称＝狂牛病〕等の疾病は、いずれも起立・歩行困難などの神経症状を示し、病原性プリオンタンパク質が関与していると考えられている。現在では、ヒトが病原性プリオンタンパク質に汚染された牛肉を食したため、感染し、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病〔variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD)〕として発症する可能性が指摘されている。そのため、特にBSEは安全な食肉の供給という観点からも極めて深刻な疾病である。

【0003】

これらの疾病は、体外より体内へ移行した病原性のプリオンタンパク質が、通常脳内に存在する正常型プリオンタンパク質の立体構造を変化させるため〔「ネイチャー (Nature)」, (英国), 1994年, 第370巻, p. 471 (非特許文献1)〕、発症すると考えられている。そのため、病原性プリオンタンパク質感染によるこれら疾病の発症を防ぐには、原因となる病原性プリオンタ

ンパク質を発病しない程度にまで分解し、無毒化する必要がある。

【0004】

しかしながら、病原性プリオンタンパク質は、通常の滅菌処理（例えば、煮沸など）においても極めて安定なタンパク質であり、それら滅菌処理によってその感染力が低下することは殆どないとされている。また、病原体はタンパク質ではあるが、プロテアーゼで分解しようとしても、従来のプロテアーゼでは完全に分解することが困難であった。そのため、病原性プリオンタンパク質を効果的に分解させ、感染による発症を低減させる方法が待ち望まれていた。

【0005】

病原性プリオンタンパク質のような難分解性タンパク質の分解の方法としては、例えば、特開平6-46871号公報（特許文献1）において、従来のプロテアーゼでは難分解性であるケラチン含有タンパク質を分解する酵素として、プロテアーゼの1種であるバチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）PWD-1菌株由来のケラチナーゼを用いる方法が提案されている。しかし、前記公報では、前記ケラチナーゼは、ケラチン含有タンパク質（例えば、獣毛、人毛、又は鳥羽毛など）の分解のために用いるとされており、病原性プリオンタンパク質に対して効果があるか否かは言及されていない。

なお、バチルス・リケニフォルミスPWD-1菌株由来のケラチナーゼのDNAは既に取得されている〔特表平10-500863号公報（特許文献2）〕。

【0006】

また、難分解性の病原性プリオンタンパク質の分解に、バチルス・リケニフォルミスPWD-1菌株由来の前記ケラチナーゼを用いることが提案されている〔「インターナショナル・シンポジウム・アドレッシング・アニマル・プロダクション・アンド・エンベロンメンタル・イシューズ（International symposium addressing animal production and environmental issues）」、（米国，ノース・キャロライナ），2001年10月3日，p. 778-781（非特許文献2）〕。しかし、病原性プリオンタンパク質をどの程度分解するかについては詳細には述べられておらず、実用的な方法も提案されていない。

【0007】

【非特許文献1】

「ネイチャー (Nature)」, (英国), 1994年, 第370巻, p. 471

【非特許文献2】

「インターナショナル・シンポジウム・アドレッシング・アニマル・プロダクション・アンド・エンベロメンタル・イシューズ (International symposium addressing animal production and environmental issues)」, (米国, ノース・キャロライナ), 2001年10月3日, p. 778-781

【特許文献1】

特開平6-46871号公報

【特許文献2】

特表平10-500863号公報

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の課題は、公知のプロテアーゼに比べて高い難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）分解活性を示し、しかも、安価に生産することができる新規プロテアーゼを提供し、更には、それを用いた難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）の分解方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

前記課題は、本発明による、下記の性質を有し、難分解性タンパク質分解活性を有する酵素：

- (a) 作用及び基質特異性：難分解性タンパク質のペプチド結合を加水分解する。
- (b) 分子量：26,000 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による)

)

(c) 等電点：pI 9.3 (ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動による)

(d) 至適 pH：pH 9.0～10.0である。

(e) 作用至適温度：60～70℃である。

によって解決することができる。

【0010】

また、本発明は、前記酵素を含む、酵素組成物に関する。

また、本発明は、前記酵素を有効成分として含有する、難分解性タンパク質分解剤に関する。

また、本発明は、前記酵素又は酵素組成物を用いる、難分解性タンパク質を分解する方法に関する。

また、本発明は、前記酵素を有効成分として含有する、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物に対する病原性プリオンタンパク質無毒化に関する。

また、本発明は、前記酵素又は酵素組成物を用いる、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物における病原性プリオンタンパク質を無毒化する方法に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の酵素は、難分解性タンパク質の分解活性、すなわち、難分解性タンパク質のペプチド結合を加水分解する活性を有する。

本明細書において、「難分解性タンパク質」とは、一般的なプロテアーゼ（例えば、プロテイナーゼK又はトリプシン等）により容易に分解されないタンパク質を意味し、より具体的には、37℃の条件下で濃度1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のプロテイナーゼKと1時間反応させても完全には分解されないタンパク質を意味する。前記難分解性タンパク質としては、例えば、病原性プリオンタンパク質、ケラチン、コラーゲン、又はエラスチン等を挙げることができる。

【0012】

本明細書において、「病原性プリオンタンパク質」とは、スクレイピー、CJD、又はBSEなどの発症に関与するタンパク質であって、具体的には、通常脳内に存在する正常型プリオンタンパク質の立体構造が変化したプリオンタンパク質を意味する。その由来としては、例えば、ヒト、ハムスター、マウス、ウシ、又はヒツジなどを挙げることができる。

【0013】

正常型プリオンタンパク質と病原性プリオンタンパク質は、アミノ酸配列は同一であるが、タンパク質の立体構造が異なる。具体的には、正常型プリオンタンパク質は、プリオンタンパク質中のポリペプチドがらせん状の形になった α -ヘリックス含有率が高く、ポリペプチドが平らなシートの形になった β -シートが少ない。それに対し、病原性プリオンタンパク質は β -シートの含有率が高い（Pan, PNAS, 90, 10962, 1993）。また、前記動物由来の各プリオンタンパク質はアミノ酸配列の相同性が高く、正常型プリオンタンパク質の立体構造変化により、難分解性を示す病原性プリオンタンパク質へ変化する特質も同じである。

【0014】

前記疾病の病原体と考えられている病原性プリオンタンパク質は、煮沸などの通常の滅菌処理においても極めて安定なタンパク質であり、その感染力が滅菌処理によって低下することは殆どない。また、体内における半減期も、正常型プリオンタンパク質は分解され易く、約2時間であるのに対し、病原性プリオンタンパク質は24時間以上を必要とし、非常に分解されにくいタンパク質である。実際に、市販のプロテイナーゼKなどの従来のプロテアーゼにより分解性を評価すると、正常型プリオンタンパク質は、容易に分解され、感受性であるのに対し、病原性プリオンタンパク質は、分解性が低い難分解性であり、抵抗性であることが示されている（Prusiner, Science, 252, 1515, 1991）。この分解の受けやすさの違いは、先述した立体構造の違いが原因であるとされている。

【0015】

正常プリオンタンパク質と病原性プリオンタンパク質の判別方法としては、例

えば、先述したプロテアーゼによる分解性の違いを利用する方法を挙げることができる。すなわち、病原性プリオンタンパク質に感染の恐れのある動物由来の組織をすりつぶして均質化した懸濁液を調製し、一般的なプロテアーゼ（例えば、プロテイナーゼKなど）により処理した後、ウェスタンブロッティング法（Burnette, Anal. Biochem., 112, 195, 1981）により、プリオンタンパク質の存在を検出する。その際、何も検出されない場合は、正常型プリオンタンパク質のみが存在していたことになるが、プロテアーゼ抵抗性を示すタンパク質バンドが検出された場合は、病原性プリオンタンパク質が存在していたことになる。

【0016】

本発明の酵素は、以下の理化学的性質を有する。

(a) 作用及び基質特異性

タンパク質のペプチド結合、特に難分解性タンパク質（例えば、病原性プリオンタンパク質など）のペプチド結合を加水分解する。基質特異性に関しては、病原性プリオンタンパク質の他に、カゼイン、コラーゲン、エラスチン、及びケラチンに対して高い分解活性を有する。

【0017】

(b) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量は約26,000である。

【0018】

(c) 等電点

ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動による等電点（pI）は約9.3である。

【0019】

(d) 至適pH及び安定pH

ケラチンアズール分解活性を指標として評価した至適pHは、約9.0～10.0である。pH約7.0～12.0の範囲において安定な活性を有し、pH約8.0～10.5において高い活性を有している。

【0020】

(e) 作用至適温度

ケラチンアズール分解活性を指標として評価した作用至適温度は、約60～70℃である。

【0021】

(f) 失活pH

ケラチンアズール分解活性を指標とした評価では、pH約5以下で失活した。

【0022】

本発明の新規酵素のこれらの性質を、難分解性タンパク質分解活性を有する公知のプロテアーゼ（バチルス・リケニフォルミスPWD-1菌株由来のケラチナーゼ）と比較した結果を、表1に示す。

【0023】

《表1》

	本発明の酵素	公知プロテアーゼ
作用及び基質特異性		
病原性プリオンタンパク質	++	+
カゼイン	+	+
コラーゲン	+	+
エラスチン	+	+
ケラチン	+	+
分子量	26,000	33,000
等電点	9.3	7.25
至適pH	9.0～10.0	7.5
至適温度	60～70℃	50℃

【0024】

本明細書において、「難分解性タンパク質分解活性」とは、難分解性タンパク質のペプチド結合を加水分解する活性を意味する。本明細書では、pH8.0及び37℃の条件下で、終濃度0.8%ケラチンアズール（Sigma社）懸濁液に酵素を16時間作用させ、この測定系において1分間あたりに反応混液の上清

へ遊離した色素量を、595 nmの吸光度で測定した時の0.001の吸光度変化量を、難分解性タンパク質分解活性の「1単位」として定義する。

なお、ケラチンアズールは、例えば、羊毛由来のケラチンにアゾ色素が結合した化合物であり、ケラチンのペプチド結合を切断して遊離したアゾ色素結合アミノ酸又はアゾ色素結合ペプチドを分光学的に定量可能なことから、難分解性タンパク質の1つであるケラチンの分解活性（すなわち、ケラチナーゼ活性）を測定するための基質として常用されている化合物である。

【0025】

また、本明細書において、「病原性プリオンタンパク質分解活性」とは、病原性プリオンタンパク質のペプチド結合を加水分解する活性を意味する。「病原性プリオンタンパク質分解活性」は、例えば、1%のスクレイピー感染マウスの脳組織懸濁液に含まれる病原性プリオンタンパク質の分解を指標として、その活性の程度（強弱）を判定することができる。

【0026】

より具体的には、病原性プリオンタンパク質に感染したマウス由来の脳組織をすりつぶして均質化した懸濁液を調製し、判定しようとする酵素又は酵素組成物により処理する。その処理物に含まれるタンパク質を電気泳動により分離し、ウェスタンブロッティング法でプリオンタンパク質の存在を検出する。その際、何も検出されない場合は、判定しようとする酵素又は酵素組成物が非常に強い病原性プリオンタンパク質分解活性を有することを示す。また同様に、プロテアーゼ抵抗性を示すタンパク質バンドが検出された場合、そのタンパク質バンドが薄い場合は、ある程度の病原性プリオンタンパク質分解活性があることを、そのタンパク質バンドが濃い場合は、病原性プリオンタンパク質分解活性が弱いことを示す。

【0027】

本発明の酵素は、これまで説明した各種理化学的性質を示す限り、その起源は特に限定されるものではなく、例えば、動物、植物、又は微生物由来の酵素であることができる。その由来としては、バチルス属に属する微生物により生産された酵素が好ましく、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus lich*

eniformis) により生産された酵素がより好ましく、バチルス・リケニフォルミス FERM P-19068 菌株により生産された酵素が特に好ましい。

なお、バチルス・リケニフォルミス FERM P-19068 菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に平成14年10月16日より寄託しているものである。

【0028】

本発明の酵素を生産する微生物から、本発明の酵素を取得するためには、その微生物に適した条件で培養を行ない、本発明の酵素を含む培養上清、菌体、又は培養物 (broth) から公知のタンパク質精製方法を用いることにより、本発明の酵素を調製することができる。以下、本発明の酵素を生産する微生物として、バチルス・リケニフォルミス FERM P-19068 菌株を例にとりて、微生物の培養及びタンパク質の精製の手順を説明する。

【0029】

1%ポリペプトン、0.2%イーストエキストラクト、及び0.1%硫酸マグネシウム・七水塩 (pH 7.0) からなる培地を常法により加熱滅菌した後、この培地にバチルス・リケニフォルミス FERM P-19068 菌株を接種し、37~50℃で通気及び攪拌しながら24~72時間培養する。得られた培養液を遠心分離器にて遠心分離 (約3000G) し、本発明の酵素を含んだ培養上清を得る。次いで、必要に応じて、分画分子量5,000~10,000の限外濾過膜にて2~50倍まで濃縮し、本発明の酵素を含んだ培養上清濃縮液を得る。

前記培養上清又は培養上清濃縮液は、本発明の酵素の他に、多くの夾雑物を含むため、例えば、以下の手順により本発明の酵素を精製することができる。

【0030】

前記培養上清又は培養上清濃縮液を、孔径約0.45 µmの精密濾過膜を用いて除菌濾過する。この除菌濾過液に終濃度1mol/Lとなるように硫酸アンモニウムを添加すると同時に、終濃度50mmol/L及びpH 8.5となるように緩衝剤 (トリスー塩酸緩衝液) で調製する。次いで、疎水クロマトグラフィー

を行なうために、フェニル・セファロースカラムに前記調製液を吸着させ、トリスー塩酸緩衝液中に硫酸アンモニウムを $1\text{ mol/L} \sim 0\text{ mol/L}$ の濃度で含むリニアグラジェント溶出を行ない、本発明の酵素を含む画分を分取する。この画分を分画分子量 $5,000 \sim 10,000$ の限外濾過膜にて $20 \sim 30$ 倍まで濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行なって更に精製する。ゲルろ過クロマトグラフィーには、例えば、スーパーデックス 75（ファルマシア社製）ゲルを用いることができる。このゲルに前記濃縮液を、 0.1 mol/L 塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液（ 0.025 mol/L , pH 7.0）を溶離液として通過させ、本発明の酵素を分取する。以上の精製操作により、電気泳動的にはほぼ1本のバンドにまで精製することが可能である。

【0031】

本発明の酵素組成物は、本発明の酵素を有効成分として含有する組成物である限り、特に限定されるものではなく、酵素組成物を調製するのに一般的に用いることのできる担体及び／又は希釈剤、例えば、賦形剤（例えば、乳糖、塩化ナトリウム、又はソルビトール等）、界面活性剤、又は防腐剤などと共に混合し、製造することができる。また、本発明の酵素組成物は、所望により、適当な形状、例えば、粉末又は液体状等に適宜調製することができる。

【0032】

酵素組成物中の酵素含量は、その使用目的に応じて十分な酵素活性が発揮可能である限り、特に限定されるものではないが、例えば、 $0.01 \sim 99$ 重量%、好ましくは $0.1 \sim 80$ 重量%の量で含有することができる。

また、難分解性タンパク質分解活性として $20 \sim 500$ 単位/g の活性を示す量で、本発明の酵素を含有することが好ましい。この酵素量は、スクレイピー感染マウスの 1% 脳組織懸濁液 1 mL 中に含まれる病原性プリオンタンパク質を分解するのに十分な量である。

【0033】

本発明の酵素組成物は、本発明の酵素に加え、更に本発明酵素以外の酵素、例えば、プロテアーゼ（例えば、ケラチナーゼ）、リパーゼ、セルラーゼ、又はキシラナーゼの少なくとも1つを含むことができる。本発明の酵素以外の酵素を併

用することにより、本発明の酵素を単独で含む酵素組成物に比べて、病原性プリオンタンパク質の分解効率をより一層向上させることが期待される。

【0034】

本発明の酵素は、難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）を分解する活性を有する。従って、本発明の酵素、又はそれを含有する本発明の酵素組成物は、難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）分解剤の有効成分として、あるいは、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物に対する病原性プリオンタンパク質無毒化剤の有効成分として有用である。

【0035】

本発明の分解剤又は無毒化剤は、有効成分である本発明の酵素を単独で含有することもできるし、あるいは、有効成分である本発明の酵素と一緒に、適当な担体及び／又は希釈剤を含有することもできる。前記担体又は希釈剤としては、有効成分である本発明の酵素の酵素活性を抑制又は阻害することがない限り、タンパク質分解剤又は無毒化剤の担体又は希釈剤として一般的に用いられている担体又は希釈剤、例えば、賦形剤（例えば、乳糖、塩化ナトリウム、又はソルビトール等）、界面活性剤、又は防腐剤を用いることができる。

【0036】

本発明の酵素又は酵素組成物を、それ単独で、あるいは、本発明の分解剤又は無毒化剤の形で用いることにより、難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）を分解することができるし、あるいは、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物において、病原性プリオンタンパク質を無毒化することができる。

すなわち、本発明の酵素又は酵素組成物を用いる、難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）を分解する方法、そして、本発明の酵素又は酵素組成物を用いる、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物における病原性プリオンタンパク質を無毒化する方法も、本発明に含まれる。

【0037】

本発明の分解方法は、本発明の酵素又は酵素組成物と、難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）又はそれを含む可能性のある分解処理対象物とを接触させる工程を少なくとも含む。また、本発明の無毒化方法は、本発明の酵素又は酵素組成物と、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある無毒化処理対象物とを接触させる工程を少なくとも含む。

前記分解処理対象物又は無毒化処理対象物（以下、併せて、単に「処理対象物」と称する）としては、例えば、病原性プリオンタンパク質を含有する可能性のある飼料（例えば、肉骨粉又は堆肥など）、病原性プリオンタンパク質が表面に付着している可能性のある器具（例えば、屠殺器具、検査用具、又は手術用具など）、あるいは、病原性プリオンタンパク質が存在する可能性のある場所（例えば、屠殺場、BSE発生牛舎、又は感染実験施設など）を挙げることができる。

【0038】

本発明の酵素又は酵素組成物と処理対象物とを接触させる方法としては、処理対象物に含まれる可能性のある難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）を、本発明の酵素の難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）分解活性により、分解することが可能な方法である限り、特に限定されるものではなく、処理対象物に応じて適宜選択することができる。

【0039】

例えば、処理対象物が、病原性プリオンタンパク質を含有する可能性のある飼料である場合には、例えば、本発明の酵素又は酵素組成物と飼料とを均一に混合するか、あるいは、本発明の酵素を含有する水溶液を飼料に散布することにより接触させることができる。

また、処理対象物が、病原性プリオンタンパク質が表面に付着している可能性のある器具である場合には、例えば、本発明の酵素を含有する水溶液中に前記器具を浸漬させる方法、本発明の酵素を含有する水溶液を前記器具に散布する方法、あるいは、本発明の酵素を含有する水溶液を含有する洗浄用用具（例えば、布、スポンジ、又はブラシなど）で前記器具の表面を拭く方法などを挙げることができる。

また、処理対象物が、病原性プリオンタンパク質が存在する可能性のある場所

である場合には、例えば、本発明の酵素を含有する水溶液を散布する方法などを挙げることができる。

【0040】

本発明方法において、本発明の酵素又は酵素組成物と処理対象物とを接触させる場合には、本発明の酵素がその難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）分解活性を十分に発揮することができる条件下で接触させることが好ましい。例えば、pHとしては、7～12の範囲で接触させることが好ましい。また、温度としては、好ましくは20～80℃、より好ましくは40～80℃の範囲で接触させることができる。

【0041】

また、その使用量も、処理対象物に含まれる難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）の量に応じて適宜決定することができる。例えば、スクレイピー感染マウスの1%脳組織懸濁液1mL中に含まれる病原性プリオンタンパク質を分解するためには、本発明の酵素量として0.5～10 μ gを用いるか、あるいは、難分解性タンパク質分解活性として20～500単位/gの活性を有する本発明の酵素組成物を用いることが好ましい。酵素量として0.5 μ g以下、あるいは、酵素組成物に含まれる難分解性タンパク質分解活性が20単位/g以下の場合には、前記含量の病原性プリオンタンパク質を完全に分解することが困難となる場合がある。また、前記含量の病原性プリオンタンパク質を完全に分解する目的で、酵素10 μ g以上、あるいは、難分解性タンパク質分解活性が500単位/g以上である酵素組成物を用いることは、生産コストを勘案すれば、現実的ではない。

【0042】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

《精製酵素の調製》

本実施例では、本発明の精製酵素を得るために、下記の手順により培養及び精

製を行なった。

まず、1%ポリペプトン（和光純薬工業社製）、0.2%イーストエキストラクト（ディフコ社製）、及び0.1%硫酸マグネシウム・七水塩（和光純薬工業社製）（pH 7.0）からなる培地（以下、培地Aと称する）を常法により加熱滅菌した後、培地A（200 mL）にバチルス・リケニフォルミス FERM P-19068 菌株を接種し、37℃で通気及び攪拌しながら72時間培養した。得られた培養液を遠心分離器にて遠心分離（3000 G，20分間）し、本発明の酵素を含んだ培養上清を得た。

【0043】

次に、分画分子量5,000の限外濾過膜にて20倍まで濃縮し、本発明の酵素を含んだ培養上清濃縮液を得た。この培養上清濃縮液を孔径0.45 µmの精密濾過膜を用いて除菌濾過した。この除菌濾過液に終濃度1 mol/Lとなるように硫酸アンモニウムを添加し、更に、終濃度50 mmol/L及びpH 8.5となるように緩衝剤（トリスー塩酸緩衝液）で調製した。次いで、疎水クロマトグラフィーを行なうために、フェニル・セファロースカラムに前記調製液を吸着させ、トリスー塩酸緩衝液中に硫酸アンモニウムを1 mol/L～0 mol/Lの濃度で含むリニアグラジェント溶出を行ない、本発明の酵素を含む画分を分取した。この画分を分画分子量5,000の限外濾過膜にて20倍まで濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行なった。ゲルろ過クロマトグラフィーには、スーパーデックス75（ファルマシア社製）ゲルを用いた。このゲルに前記濃縮液を、0.1 mol/L塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液（0.025 mol/L，pH 7.0）を溶離液として通過させ、本発明の酵素を分取した。以上の精製操作により、本発明の精製酵素（20 µg）を取得した。

【0044】

【実施例2】

《酵素の理化学的性質の確認》

（1）作用及び基質特異性

実施例1で得た精製酵素の各種基質（カゼイン、コラーゲン、エラスチン、及びケラチン）に対する活性を調べた。結果を表2に示す。

表2に示すように、いずれの基質に対しても高い分解活性を示したが、特にケラチンに高い分解活性を示した。なお、表2における分解活性とは、基質濃度0.5%、pH9.0、及び60℃の条件下において、1分間に $1\mu\text{mol/L}$ のグリシンに相当するニンヒドリン発色力を有する酵素量を1単位(U)として比較したものである。

【0045】

《表2》

基質	分解活性 (U)
カゼイン	326677
コラーゲン	36958
エラスチン	10501
ケラチン	7187

【0046】

(2) 分子量

実施例1で得た精製酵素の分子量を決定するため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(15%均一ゲル;アト-社製)を行なった。その結果、病原性プリオンタンパク質分解酵素の分子量は約26,000と算出された。なお、本試験に用いた標準マーカーは、プロテインスタンダード(バイオ・ラド社製)を用いた。

【0047】

(3) 等電点

実施例1で得た精製酵素の等電点(pI)を決定するため、LKB両性等電点電気泳動装置を用いてポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動を行なった。その結果、病原性プリオンタンパク質分解酵素の等電点は9.3と算出された。なお、この試験に用いた標準サンプルの等電点は、表3のとおりである。

【0048】

《表3》

標準サンプル	等電点
--------	-----

トリプシノーゲン	9.30
レンチル レクチン塩基性バンド	8.65
レンチル レクチン中性バンド	8.45
レンチル レクチン酸性バンド	8.15
ウマ ミオグロビン塩基性バンド	7.35
ウマ ミオグロビン酸性バンド	6.85
ヒト カルボニックアンヒドラーゼB	6.55
ウシ カルボニックアンヒドラーゼB	5.80
β -ラクトグロブリンA	5.20
ダイズ トリプシンインヒビター	4.55
アミログルコシダーゼ	3.50

【0049】

(4) 至適pH及び安定pH

実施例1で得た精製酵素の37℃における至適pHについて、ケラチンアズール(Sigma社)分解活性を指標として測定した結果、図1に示すように、pH9.0~10.0であった。また、37℃における安定pHは、図1に示すように、pH7.0~12.0、好ましくは8.0~10.5であった。

【0050】

(5) 至適温度

実施例1で得た精製酵素の至適温度について、ケラチンアズール分解活性を指標として、至適pHであるpH9.0で測定した結果、図2に示すように、60~70℃であった。

【0051】

【実施例3】

《酵素組成物の調製》

本発明の酵素組成物を得るために、実施例1に記載の培地A(200mL)に、バチルス・リケニフォルミスFERM P-19068菌株を接種し、37℃で通気及び攪拌しながら48時間培養した。得られた培養液を遠心分離器にて遠

心分離（3000 G，30 分間）し、本発明の酵素を含んだ培養上清を得た。次に、分画分子量 5,000 の限外濾過膜にて 30 倍まで濃縮し、培養上清濃縮液を得た。この培養上清濃縮液を孔径 0.45 μ m の精密濾過膜を用いて除菌濾過し、本発明の酵素を含んだ酵素組成物溶液 A を得た。この酵素組成物 A の難分解性タンパク質分解活性は、285 単位/g であった。

【0052】

一方、0.01% イーストエキストラクト（ディフコ社製）、1% フェザーミール（伊藤忠飼料社製）、0.01% 塩化マグネシウム（和光純薬工業社製）、0.04% リン酸水素二カリウム（和光純薬工業社製）、0.03% リン酸水素一カリウム（和光純薬工業社製）、0.05% 塩化ナトリウム（和光純薬工業社製）、及び 0.05% 塩化アンモニウム（和光純薬工業社製）（pH 7.0）からなる培地（以下、培地 B と称する）を加熱滅菌した後、培地 B（40 mL）に、バチルス・リケニフォルミス PWD-1（ATCC-53757）菌株を接種し、37℃ で通気及び攪拌しながら 48 時間培養した。得られた培養液を遠心分離器にて遠心分離（3000 G，30 分間）し、培養上清を得た。次に、分画分子量 5,000 の限外濾過膜にて 18 倍まで濃縮し、培養上清濃縮液を得た。この培養上清濃縮液を孔径 0.45 μ m の精密濾過膜を用いて除菌濾過し、比較用の酵素組成物溶液 B を得た。

【0053】

【実施例 4】

《精製酵素を用いたマウス由来病原性プリオンタンパク質の分解》

本実施例では、実施例 1 で述べた方法に従って調製した本発明の精製酵素と、市販されているプロテアーゼ〔ズブチリシン・カールスバーグ（Subtilisin Carlsberg）；Sigma 社製〕とを用いて、本発明の酵素の病原性プリオンタンパク質分解能を、酵素標品〔プロテイナーゼ K（Proteinase K）；和光純薬社製〕による分解能を基準として評価した。

【0054】

本実施例においては、基質として、病原性プリオンタンパク質感染マウス〔「クリニカル・アンド・ディアグノスティック・ラボラトリー・イムノロジー（C

CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY)」、(米国), アメリカン・ソサエティー・フォー・マイクロバイオロジー (American Society for Microbiology (Asm)), 1995年3月, p. 172-176] の脳から5% ホモジネート [2% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム, 10 mmol/L-Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)] を調製し、そのホモジネートを最終濃度1%になるように50 mmol/L-Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3) で希釈したものをを用いた。

酵素反応は、前記1%脳ホモジネートを、等容量の精製酵素溶液、市販プロテアーゼ溶液、又は酵素標品溶液と混和した後、37℃で1時間インキュベートする方法により実施した。精製酵素、市販プロテアーゼ、及び酵素標品の濃度は、酵素反応時の反応混液における最終濃度として、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 及び $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ の2段階とした。

【0055】

酵素反応の終了した反応混液の一部を、電気泳動装置 (ATTO社製) と SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%ゲル; ATTO社製) とを用い、電気泳動 [Sodium Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)] した。SDS-PAGE後のポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を、転写装置 (ATTO社製) にて、添付のプロトコールに従い、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (Millipore社製) に転写した。この膜に結合した病原性プリオンタンパク質に対し、抗プリオンタンパク質-ウサギ抗体を1次抗体、抗ウサギ IgG-ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗体 (Zymed社) を2次抗体として、抗原抗体法により標識した。その後、市販の標識及び検出システム (ECL+Plus Western Blotting Detection System; アマシャム・バイオサイエンス社製) により、添付のプロトコールに従って、病原性プリオンタンパク質の検出を実施した。

【0056】

なお、1次抗体として用いた抗プリオンタンパク質-ウサギ抗体は、ヒツジス

クレイビープリオンタンパク質のコアフラグメント P27-30 の N 末端配列にシステイン (Cys) を付加した 20 アミノ酸からなるペプチド (PrP94-112) を合成し、このペプチドにスカシガイヘモシアニン [Keyhole limpet hemocyanin (KLH)] を付加したものを免疫原としてウサギに免疫し、得られた抗血清からプロテイン A カラムを用いて精製することにより調製した。この抗体は、ヒツジプリオンタンパク質だけでなく、ハムスター、マウス、及びウシの各プリオンタンパク質とも反応する。

【0057】

結果を図 3 に示す。図 3 に示すように、基準となるプロテイナーゼ K、あるいは、市販プロテアーゼのズブチリシン・カールスバーグでは、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でも病原性プリオンタンパク質の存在を示すプロテアーゼ抵抗性のバンドが検出された。なお、これらのバンドの分子量は、全く分解を受けていないバンドが 32 kDa であり、部分的に分解されたバンド (3 本) が 30 kDa 、 $25 \sim 26 \text{ kDa}$ 、及び $20 \sim 21 \text{ kDa}$ であった。それに対して、本発明の精製酵素においては、 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ でバンドが検出されたが、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では、1% の脳ホモジネートに含まれる病原性プリオンタンパク質をほとんど分解することが可能であった。

【0058】

【実施例 5】

《酵素組成物を用いたマウス由来病原性プリオンタンパク質の分解》

実施例 3 で述べた方法に従って調製した本発明の酵素組成物溶液 A を用いて、マウス由来の病原性プリオンタンパク質分解能を評価した。その際、酵素標品 (プロテイナーゼ K; 和光純薬社製) による分解能を基準とした。また、基質としては実施例 4 で用いたものと同じ基質 (すなわち、病原性プリオンタンパク質感染マウス由来の 1% 脳ホモジネート) を使用した。

【0059】

酵素反応は、前記 1% 脳ホモジネートを等容量の酵素組成物溶液又は酵素標品溶液と混和した後、 37°C で 1 時間インキュベートする方法により実施した。酵素標品の濃度は、最終濃度として $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 12.5μ

g/mL、及び 6.25 μ g/mL の 4 段階とし、酵素組成物 A については、前記組成物溶液を 1、1/2、1/4、1/8、及び 1/16 に希釈したものをを用いた。なお、前記組成物の各希釈物の難分解性タンパク質分解活性は、それぞれ、285 単位/g、143 単位/g、71 単位/g、36 単位/g、及び 18 単位/g であった。

酵素反応の終了した反応混液の一部を、実施例 4 で述べた方法に従って、病原性プリオンタンパク質の検出を実施した。

【0060】

結果を図 4 に示す。図 4 に示すように、基準となるプロテイナーゼ K では、50 μ g/mL の高濃度においても、病原性プリオンタンパク質の存在を示す、プロテアーゼ抵抗性のタンパク質のバンドが検出された。それに対して、本発明の酵素組成物においては、18 単位/g の難分解性タンパク質分解活性を有する酵素組成物（1/16 希釈物；培養上清の 1.875 倍濃縮液）でわずかにバンドが検出されたが、36 単位/g（1/8 希釈物；培養上清の 3.75 倍濃縮液）以上の難分解性タンパク質分解活性を有する酵素組成物では、完全に分解されることが明らかとなった。

【0061】

【実施例 6】

《酵素組成物を用いたヒツジ由来病原性プリオンタンパク質の分解》

実施例 3 で述べた方法に従って調製した本発明の酵素組成物溶液 A 及び比較用の酵素組成物溶液 B を用いて、ヒツジ由来の病原性プリオンタンパク質分解能を、酵素標品（プロテイナーゼ K；和光純薬社製）による分解能を基準として評価した。

基質としては、病原性プリオンタンパク質感染ヒツジの脳から 5% ホモジネート〔2% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、10 mmol/L-Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5）〕を調製し、そのホモジネートを最終濃度 1% になるように 50 mmol/L-Tris-HCl 緩衝液（pH 8.3）で希釈したものをを用いた。

【0062】

酵素反応は、前記 1% 脳ホモジネートを等容量の酵素組成物溶液又は酵素標品溶液と混和した後、37℃で 1 時間インキュベートする方法により実施した。酵素標品の濃度は、最終濃度として $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。一方、本発明の酵素組成物 A は、難分解性タンパク質分解活性として 285 単位/g、143 単位/g、71 単位/g、及び 36 単位/g のもの（希釈倍率として 1、1/2、1/4、及び 1/8）を、比較用酵素組成物 B は、37 単位/g、19 単位/g、9 単位/g、及び 5 単位/g のもの（希釈倍率として 1、1/2、1/4、及び 1/8）を用いた。

酵素反応の終了した反応混液の一部は、実施例 4 で述べた方法に従って、病原性プリオンタンパク質の検出を実施した。

【0063】

結果を図 5 に示す。図 5 に示すように、基準となるプロテイナーゼ K では、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度において、病原性プリオンタンパク質の存在を示す、プロテアーゼ抵抗性のタンパク質のバンドが検出された。また、比較用の酵素組成物 B は、いずれの濃度においても、病原性プリオンタンパク質は分解されなかった。それに対し、本発明の酵素組成物 A においては、いずれの濃度においてもほぼ完全に分解されることが明らかとなった。また、病原性プリオンタンパク質の由来が異なり、アミノ酸配列が若干異なる場合でも、本酵素には病原性プリオンタンパク質を分解する能力があることが明らかとなった。

【0064】

【実施例 7】

《酵素組成物を用いたマウス由来病原性プリオンタンパク質の分解》

バチルス・リケニフォルミス PWD-1 菌株を実施例 3 に記載の本発明の酵素組成物 A と同様の方法（すなわち、培地 A を用いて）で培養した後、実施例 3 に記載の酵素組成物 A と同様の方法で、比較用の酵素組成物 C を調製した。

また、バチルス・リケニフォルミス DSM-8782 菌株を実施例 3 に記載の酵素組成物 A と同様の方法（すなわち、培地 A を用いて）で培養した後、実施例 3 に記載の酵素組成物 A と同様の方法で、比較用の酵素組成物 D を調製した。

更に、バチルス・リケニフォルミス DSM-8782 菌株を実施例 3 に記載の

比較用酵素組成物 B と同様の方法（すなわち、培地 B を用いて）で培養した後、実施例 3 に記載の酵素組成物 B と同様の方法で、比較用の酵素組成物 E を調製した。

表 4 に、各酵素組成物と菌株及び培地との関係を示す。なお、培地 B は、ケラチナーゼ誘導培地（特開平 6-46871 号公報）である。

【0065】

《表 4》

酵素組成物	菌株	培地
A	FERM P-19068 菌株	A
B	PWD-1 菌株	B
C	PWD-1 菌株	A
D	DSM-8782 菌株	A
E	DSM-8782 菌株	B

【0066】

このようにして調製した本発明の酵素組成物 A 及び比較用の 4 種類の酵素組成物 B～E について、各酵素組成物の最終濃度を培養上清の 18 倍濃縮としたこと以外は、実施例 6 に記載の手順に従って、マウス由来の病原性プリオンタンパク質分解能を比較した。

結果を図 6 に示す。図 6 に示すように、比較用の酵素組成物 B～E においては、病原性プリオンタンパク質を分解することはできなかった。しかし、本発明の酵素組成物 A では、完全に分解されることが明らかとなった。

【0067】

【発明の効果】

本発明の酵素は、公知のプロテアーゼに比べて、難分解性タンパク質、特に病原性プリオンタンパク質に対して高い分解活性を有する。従って、本発明の酵素又はそれを含有する本発明の酵素組成物によれば、病原性プリオンタンパク質を効果的に分解することができる。また、本発明の酵素は、安価に生産することができる。

本発明の酵素又は酵素組成物によれば、病原性プリオンタンパク質に汚染された可能性のある処理対象物の汚染を除去することができる。また、本発明の酵素は、本発明の病原性プリオンタンパク質分解剤又は汚染除去剤の有効成分として有効である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明による精製酵素の 37℃における至適 pH 及び安定 pH 範囲を示すグラフである。

【図 2】

本発明による精製酵素の pH 9.0 における至適温度範囲を示すグラフである。

【図 3】

本発明の精製酵素による、マウス由来の病原性プリオンタンパク質の分解を示す、図面に代わる写真である。

【図 4】

本発明の酵素組成物 A による、マウス由来の病原性プリオンタンパク質の分解を示す、図面に代わる写真である。

【図 5】

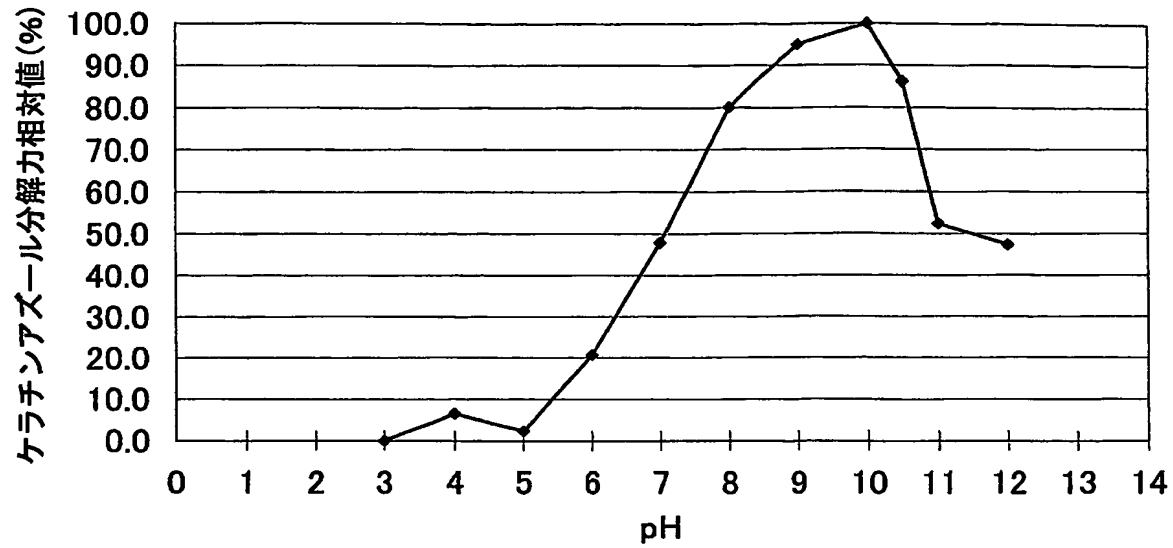
本発明の酵素組成物 A による、ヒツジ由来の病原性プリオンタンパク質の分解を示す、図面に代わる写真である。

【図 6】

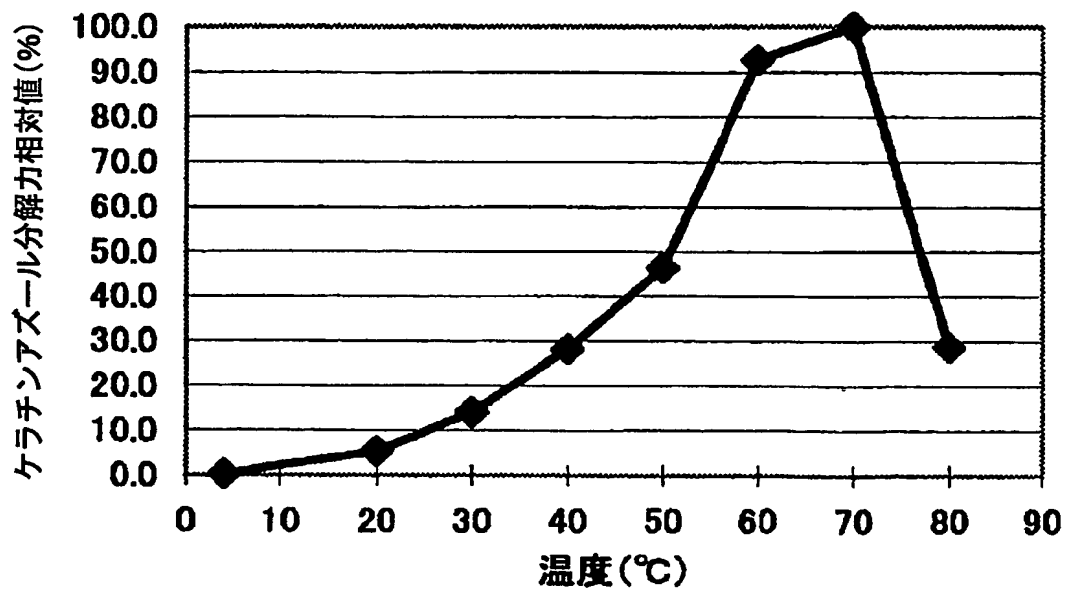
本発明の酵素組成物 A による、マウス由来の病原性プリオンタンパク質の分解を示す、図面に代わる写真である。

【書類名】 図面

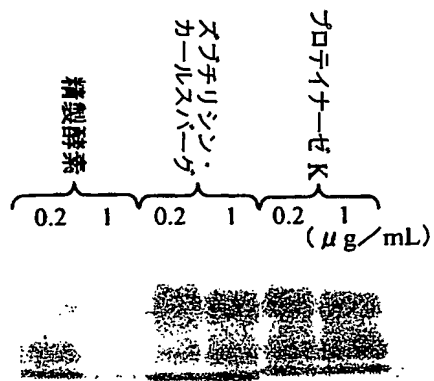
【図 1】



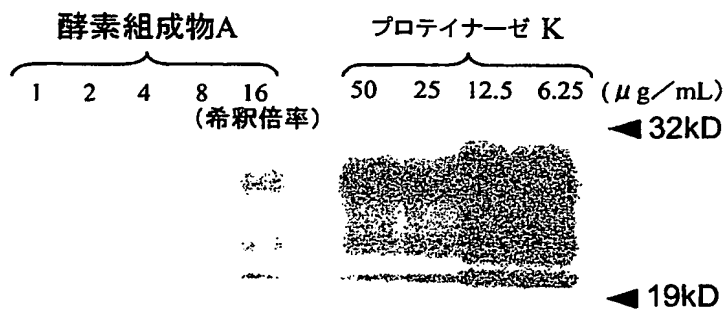
【図 2】



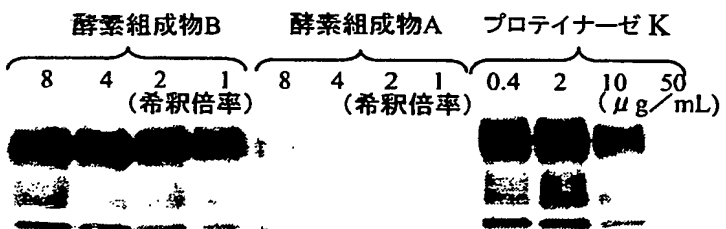
【図 3】



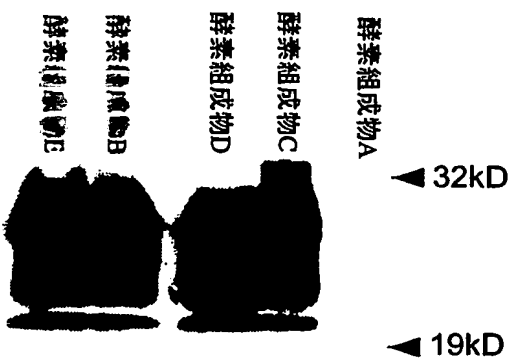
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 公知のプロテアーゼに比べて高い難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）分解活性を示し、しかも、安価に生産することができる新規プロテアーゼ、及びそれを用いた難分解性タンパク質（特には、病原性プリオンタンパク質）の分解方法を提供する。

【解決手段】 前記酵素は、（a）難分解性タンパク質のペプチド結合を加水分解し、（b）分子量は26,000であり、（c）等電点はpI 9.3であり、（d）至適pHはpH 9.0～10.0であり、（e）作用至適温度は60～70℃である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 0 9 2 4 8
受付番号	5 0 2 0 1 6 0 1 2 6 3
書類名	特許願
担当官	森吉 美智枝 7 5 7 7
作成日	平成 1 5 年 1 月 6 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年10月24日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-309248

出願人履歴情報

識別番号

[000006091]

1. 変更年月日

1990年 8月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋 2 丁目 4 番 16 号

氏 名

明治製菓株式会社

特願 2002-309248

出願人履歴情報

識別番号

[501203344]

1. 変更年月日

2001年 5月22日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台3-1-1

氏 名

独立行政法人 農業技術研究機構

2. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

茨城県つくば市観音台3-1-1

氏 名

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構